PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6: (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/23506 A1 A61K 31/70 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. August 1996 (08.08.96) (81) Bestimmungsstaaten: BR, JP, KR, MX, NO, US, europäisches (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/00169 Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). (22) Internationales Anmeldedatum: 31. Januar 1996 (31.01.96) Veröffentlicht (30) Prioritätsdaten: Mit internationalem Recherchenbericht. 1. Februar 1995 (01.02.95) DE 195 03 152.0 Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen 195 45 892.3 8. December 1995 (08.12.95) DE Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen. (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWAN DTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 54, D-80636 München (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FAHRIG, Rudolf [DE/DE]; Fritz-Goy-Weg 3, D-30657 Hannover (DE). STEINKAMP-ZUCHT, Angela [DE/DE]; Roonstrasse 3, D-30161 Hannover (DE). BUTENSCHÖN, BERGMANN, NÖTH, REIT-(74) Anwalt: ZLE, GRAMBOW, KRAUS; Mozartstrasse 17, D-80336 München (DE).

- (54) Title: USE OF 5'SUBSTITUTED NUCLEOSIDES TO PROVIDE RESISTANCE IN CYTOSTATIC TREATMENT AND MEDICA-MENTS CONTAINING SAID NUCLEOSIDES
- (54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON 5' SUBSTITUIERTEN NUKLEOSIDEN ZUR HEMMUNG VON RESISTENZBILDUNG BEI DER ZYTOSTATIKABEHANDLUNG UND ARZNEIMITTEL, ENTHALTEND DIESE NUKLEOSIDE

(57) Abstract

The invention relates to the use of 5'substituted nucleosides in combination with at least one cytostatic in the production of a medicament to prevent or reduce the build-up of resistance in cytostatic treatment and a medicament containing BVDU and/or its metabolites.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von 5'-substituierten Nukleosiden in Kombination mit mindestens einem Zytostatikum zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verhinderung bzw. Reduktion der Resistenzbildung bei der Zytostatikabehandlung sowie ein Arzneimittel, enthaltend BVDU und/oder seine Metaboliten.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	мх	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neusceland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	П	Italien	PT	
BJ	Benin	JР	Japan	RO	Portugal Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Russische Föderation
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea		Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SE	Schweden
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SG	Singapur
CH	Schweiz	L	Liechtenstein	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slowakei
CM	Kamenin	LR	Liberia	SN	Senegal
CN	China	LK	Litanen	SZ	Swasiland
CS	Tschechoslowskei	LU		TD	Tschad
CZ	Tschechische Republik	LV	Luxemburg Lettland	TG	Togo
DE	Deutschland	MC		TJ	Tadachikistan
DK	Dinemark	MD	Monaco	77	Trinidad und Tobago
EE	Estland	MG	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanier		Madagaskar	UG	Uganda
FI	Finnland	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FR	Prankreich	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
GA	Gabon	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
UA.	Cabon	MW	Malawi		

VERWENDUNG VON 5' SUBSTITUIERTEN NUKLEOSIDEN ZUR HEMMUNG VON RESISTENZBIL-DUNG BEI DER ZYTOSTATIKABEHANDLUNG UND ARZNEIMITTEL, ENTHALTEND DIESE NUKLEOSIDE

5

10

15

20

Das Auftreten von "Arzneimittel-Resistenz" ist der Hauptgrund für Fehlschläge in der Krebs-Chemotherapie. Tumoren, welche anfangs empfindlich auf Zytostatika reagieren, erholen sich sehr häufig nach einer gewissen Behandlungszeit und sind dann resistent gegenüber der Wirkung verschiedenartiger antineoplastischer Arzneimittel. Obwohl das Problem der "Arzneimittel-Resistenz" schon seit 1948, dem Beginn der Krebstherapie mit Zytostatika, bekannt ist, wurde bis heute kein Weg gefunden, die Resistenzbildung zu verhindern. Charakteristisch für alle bisher untersuchten hochresistenten Tumoren und Zellinien ist die Amplifikation (Vervielfachung) einer kleinen Gruppe von Genen. Als Folge dieser DNA- oder Genamplifikation kann eine erhöhte Expression dieser Gene nach-

5

gewiesen werden, welche zur Resistenz gegenüber dem Arzneimittel führt. Als Folge dieser DNA-Amplifikation kann eine erhöhte Expression verschiedener Gene nachgewiesen werden. Schutzproteine, die zur Ausschleusung von Giftstoffen aus der Zelle dienen, können so vermehrt gebildet werden (P-Glycoprotein). Dieser Effekt wird auch als "multi-drug-resistance" (MDR) bezeichnet.

10 Zusätzlich zur MDR korreliert der Amplifikationsgrad gewisser Gene, vor allem gewisser Onkogene, mit dem Grad der Malignität. So sind die Überlebenschancen bei einer Amplifikation von ERVV2, RASKI, INT3, HST1, MYC und KSRAM beim Magenkrebs (Hirohasi, S., and 15 Sugimura, T. Genetic alterations in human gastric cancer. Cancer cells (Cold Spring Habor), 3:49-52, 1991) und ERBB2 und MYC beim Ovarkarzinom (Sasano, H., Garrett, C.T., Wilkinson, D.S., Silverberg, S., Comerford, J., and Hyde, J. Protooncogene amplifica-20 tion and tumor ploidy in human ovarian neoplasm. Hum.Pathol., 21:382-391,1990) sehr schlecht. Beim Brustkrebs korreliert die Amplifikation von MYC (Borg, A., Baldetorp, B., Fernö, M., Olsson, H., and Sigurdsson, H. C-myc amplification is an independent 25 prognostic factor in postmenopausal breast cancer. Int. J. Cancer, 51:687-691,1992) und Co-Amplifikation von INT2 und HST1 (Borg, A., Sigurdsson, H., Clark, G..M., et al., Association of INT2/HST1 coamplification in primary breast cancer with hormone-dependent 30 phenotype and poor prognosis. Br.J.Cancer, 63:136-142, 1991) mit dem Krankheitsverlauf. Die Amplifikation von ERBB2 (Descotes, F., Pavy, J.-J., and Adessi, G.L. Human breast cancer: Correlation study between HER-2/neu amplification and prognostic 35 factors in an unselected population. Anticancer Res.,

13:119-124,1993) und EGFR (Klijn, J.G.M., Berns, P.M.J.J., Schmitz, P.I.M., and Foekens, J.A. The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. Endocr.Rev., 13:3-17,1992) ist mit einem schlechten Krankheitsverlauf verbunden. Beim Ösophaguskarzinom korreliert die Co-Amplifikation von HST1 und INT2 mit dem Grad der Metastasierung (Tsuda, T., Tahara, E., Kajiyama, G., Sakamoto, H., Terada, M., and Sugimura, T. High incidence of coamplification of hst-1 and int-2 genes in human esophageal carcinomas. Cancer Res. 49:5505-5508,1989).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß durch chronische Behandlung mit kanzerogenen Zytostatika induzierte Genamplifikation nicht nur zur Resistenz gegenüber dieser Behandlung führt, sondern auch zur Überexpression gewisser Onkogene, welche den Grad der Malignität kontrollieren.

Es sind eine Reihe von Substanzen beschrieben worden, die der erworbenen Arzneimittelresistenz entgegenwirken. Hierzu gehören die von Kennedy (Kennedy, A.R., Prevention of Carcinogenesis by Protease Inhibitors, Cancer Res., 54:1999-2005,1994) beschriebenen Arbeiten über die anti-kanzerogenen Wirkungen von Protease-Inhibitoren. Diese können kanzerogeninduzierte Genamplifikation auf nahezu normale Level herunterdrücken. Kennedy beobachtete, daß strahleninduzierte Genamplifikation in gleicher Weise unterdrückt wird, wie es ihrer Fähigkeit entspricht, strahleninduzierte Transformation zu unterdrücken, so daß auf einen Zusammenhang zwischen beiden Prozessen geschlossen wird. Darüber hinaus wirken Protease-Inhibitoren als Antagonisten von (co-rekombinogenen) Tumor-Promotoren

5

25

30

35

4

PCT/DE96/00169

bei Auslösung von Transformation in vitro. Protease-Inhibitoren werden auch als wirkungsvolle Anti-Promotoren in In-vivo-Untersuchungen beschrieben (Troll, W., Klassen, A., and Janoff, A. Tumorigenesis in mouse skin: inhibition by synthetic inhibitors of proteases. Science (Washington DC) 169:1211-1213, 1970).

Aus der Literaturstelle Moscow, I.A., and Cowan, K.H.

Multidrug resistance. J.Natl.Cancer Inst. 80: 14-20,
1988, ist bekannt, daß Verapamil der MDR entgegenwirkt. Dieser "calcium channel blocker" erhöht die
Zytotoxizität durch Erhöhung der intrazellulären Akkumulation von Arzneimitteln. Wahrscheinlich geschieht dies durch eine Wirkung auf das P-Glykoprotein oder andere Transportproteine. Die Toxizität
dieser und ähnlicher Substanzen, wie z.B. Quinidin,
steht ihrem klinischen Einsatz im Wege.

Ausgehend hiervon, ist es die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine wirksame Substanz zur Verhinderung bzw. Reduzierung der Resistenzbildung gegenüber der Zytostatikabehandlung anzugeben und ein entsprechendes Arzneimittel vorzuschlagen.

> Die Aufgabe in bezug auf die Substanz wird durch die kennzeichnenden Merkmale des Anspruches 1 gelöst, in bezug auf das Arzneimittel durch die Merkmale des Anspruches 9.

> Erfindungsgemäß wird somit vorgeschlagen, die Resistenzbildung durch gleichzeitige Gabe von 5' substituierten Nukleosiden und einem Zytostatikum zu verhindern bzw. zu reduzieren. Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß 5' Nukleoside die Entstehung

5

20

25

30

35

von kanzerogeninduzierten Genamplifikationen verhindert oder zumindest abschwächt. Dadurch wird die Möglichkeit eröffnet, durch gleichzeitige Gabe dieser Nukleoside mit einem Zytostatikum die Entstehung von Resistenzen gegenüber diesem Arzneimittel zu verhindern und auch den Grad der Malignität zu beeinflussen.

Als Beispiel für 5'Nukleoside sind zu nennen: 5-(2bromovinyl-2'-deoxyuridin (BVDU), (E)-5-(2-bromovinyl)-1-B-D-arabinofuranosyluracil, (E)-5-(2-bromovinyl-2'-deoxy-4'-thiouridin. Abb. 2: 5-Jodo-2'-dexycytidin, 5-Jodo-2'-deoxyuridin, 2'-Deoxy-5-trifluoromethyluridin, besonders bevorzugt ist BVDU und (E)-5(2-Bromovinyl-)uracyl (BVU).

Die Erfindung betrifft weiterhin Arzneimittel zur Verhinderung der Resistenzenbildung gegenüber Zytostatikabehandlung, die 5' Nukleoside enthalten. Die 5' Nukleoside sind dabei in der Formulierung des Arzneimittels in einer Menge enthalten, aus der eine Konzentration von 0,02 μ g/ml bis 10 μ g/ml im Blut resultiert. In Versuchen konnte gezeigt werden, daß der optimale Bereich bei 0,05 μ g/ml bis 5 μ g/ml liegt.

Die Zytostatika können dabei in den üblichen bisher bekannten Mengen in der Formulierung enthalten sein (Oshiro, Y., Piper, C.E., Balwierz, P.S., and Garriot, M.L. (1992) Genotoxic properties of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (BVDU). Fundamental and Applied Toxicology, 18, 491-498). Beispiele für Zytostatika sind Cyclophosphamid und andere Alkylantien, Antimetabolite wie Methotrexat, Alkaloide wie Vinblastin, Antibiotika wie Bleomycin, Cisplatin so-

6

wie andere Stoffe. Weitere Beispiele für Zytostatika sind aus "Rote Liste 1995", Editio Cantor Verlag für Medizin und Naturwissenschaften, Aulendorf/Württ., 1995, zu entnehmen.

5

Die Träger-, Zusatz- und Hilfsstoffe entsprechen denen, wie sie bisher aus dem Stand der Technik bekannt sind. Das Arzneimittel selbst kann dabei in fester oder flüssiger Form oder auch als Spray vorliegen.

10

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Modellversuchen näher erläutert.

A. Modellsubstanzen

15

20

Für die Untersuchung von Amplifikationsphänomenen dient eine Hamsterzellinie, die ein Virus (Simian Virus 40) im Genom integriert enthält. Bekannt ist für diese Zellinie, daß eine Zugabe genotoxischer Substanzen, aber auch verschiedener "nichtgenotoxischer" Kanzerogene und Tumor-Promotoren zur Amplifikation von SV40-DNA im Hamstergenom führt. Die Methode beruht darauf, daß als Sonde dienende markierte SV40-DNA mit Hamsterzell-DNA, die SV40-DNA in amplifizierter Kopienzahl enthält, hybridisiert wird. Die Menge gebundener Sonde gibt Aufschluß über den Amplifikationsgrad der integrierten Virus-DNA.

30

25

Zur Bestimmung des Amplifikationsgrades wird gleichzeitig mit der SV40-DNA die Albumin-Gen-DNA gemessen. Das Albumin-Gen wird nämlich im Gegensatz zur SV40-DNA in der Zelle nicht amplifiziert. Der Wert des relativen SV40-DNA-Gehalts ergibt sich demnach aus dem Quotienten des Signals der mit SV40-DNA hybridisierten DNA-Sonde zu dem Signal der mit Albumin-Gen hybridisierten DNA-Sonde aus denselben SV40-transformierten embryonalen CO631-Hamsterzellen.

5

15

20

Als Modellsubstanzen dienten:

- Mutagene und rekombinogene genotoxische Kanzerogene (Positiv-Kontrolle)
- Triethylenmelamin (TEM)
 4-Nitrochinolin 1-Oxid (4-NQO)
 - Nicht-Kanzerogene (Negativ-Kontrolle), welche weder Mutationen noch Rekombinationen induzieren Aceton Dimethylformamid
 - 3. Co-rekombinogene Tumor-Promotoren

 Mezerein

 12-0-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA)

 Chrysarobin

 Coumarin
- 4. Rekombinogene nicht-genotoxische Kanzerogene mit
 25 unbekanntem Wirkmechanismus
 Thioacetamid
 Acetamid
- 5. Testosteron nach Metabolisierung durch Rattenle30 bermikrosomen (S9-Mix) sowie ohne S9-Mix
 Testosteron wirkt
 mit S9-Mix anti-rekombinogen und
 ohne S9-Mix co-rekombinogen

Die Wirkung der obengenannten Modellsubstanzen allein oder in Kombination mit einem Kanzerogen wurde im Genamplifikations-System untersucht.

Die Ergebnisse mit den Modellsubstanzen sind in den Figuren 1 bis 3 zusammengefaßt.

Die Nicht-Kanzerogene Aceton und Dimethylformamid zeigen keine Wirkung.

10

15

30

Alle anderen Substanzen, die nicht-genotoxischen Kanzerogene mit unbekanntem Wirkmechanismus, Thioacetamid und Acetamid, die genotoxischen Kanzerogene TEM und 4-NQO sowie die Tumor-Promotoren Mezerein, 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA), Chrysarobin und Coumarin, für sich allein gegeben, erhöhen

Teststeron erniedrigt mit S9-Mix die amplifizierende Wirkung von Methotrexate (MTX), ohne S9-Mix erhöht es die amplifizierende Wirkung von Amino-6-mercaptopurin (AMP).

die SV40-Genamplifikation.

Diese Ergebnisse zeigen eine Übereinstimmung zwischen der Auslösung von Rekombination und SV40-Genamplifikation.

B. Hemmung kanzerogeninduzierter Genamplifikation durch (E)-5-(2-Bromovinyl-)-2'-deoxyuridine (BVDU)

Die Ergebnisse sind in den Figuren 4 bis 7 zusammengefaßt.

5

BVDU hatte im Versuch mit Hefen (Figur 4) eine antirekombinogene und co-mutagene Wirkung gezeigt. Diese
Wirkung war in Gegenwart von Lebermikrosomen (S9-Mix)
in niedrigeren Konzentrationen sichtbarer als in Abwesenheit von S9-Mix und auch sehr viel ausgeprägter.
Eine Metabolisierung von BVDU verstärkt also den
antirekombinogenen Effekt.

- BDVU zeigt in klinisch relevanten Dosen eine Hemmung AMP-induzierter Genamplifikation. Der Effekt setzt bei etwa 0,05 μ g/ml ein und führt dosisabhängig bei 5 μ g/ml zu einer vollständigen Hemmung der AMP-induzierten Genamplifikation (Figur 5).
- Der unabhängige Wiederholungsversuch bestätigt das Ergebnis (Figur 6). Darüber hinaus scheint BVDU allein den spontanen Amplifikationsgrad leicht zu erniedrigen.
- Zugabe von S9-Mix zeigt ebenfalls eine Erniedrigung AMP-induzierter Genamplifikation. Dieser erfolgt allerdings in einem niedrigeren Dosisbereich als in den Versuchen ohne S9-Mix. Eine mögliche Metabolisierung von BVDU scheint den amplifikationshemmenden Effekt also noch zu verstärken (Figur 7). Dies würde die Relevanz der Ergebnisse noch verstärken.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß BVDU kanzerogeninduzierte Genamplifikation hemmt. Dies eröffnet

die Möglichkeit, durch gleichzeitige Gabe von BVDU
mit einem Zytostatikum die Entstehung von Resistenzen
gegenüber diesem Arzneimittel zu verhindern und die
Malignität zu erniedrigen.

10

C. Verhinderung der Bildung von "Multi-Drug-Resistance" (MDR) in menschlichen und tierischen Tumorzellen gegenüber Zytostatikabehandlung durch gleichzeitige Gabe von BVDU

5

10

15

20

25

30

Die menschliche Tumorzellinie K562-WT (Fig. 8) und die Tumorzellinie F46-WT der Maus (Fig. 9) (WT = Wildtyp = empfindlich gegenüber Zytostatikabehandlung = keine Amplifikation des MDR-Gens) wurde über mehrere Wochen mit stufenweise steigenden Konzentrationen von Adriamycin behandelt. Im Laufe der Behandlung erwarben die Zellen eine Resistenz gegenüber dieser Behandlung. Wirken gegenüber nichtresistenten Zellen 20 ng/ml Adriamycin bei einer Behandlungszeit von 4 Tagen stark toxisch, so sind die Zellen nach Langzeitbehandlung mit stufenweise steigenden Konzentrationen gegenüber 20 ng/ml Adriamycin völlig unempfindlich geworden (Figuren 8 und 9). Die Resistenzbildung beruht auf der Amplifikation des MDR-Gens. Nachgewiesen wird dies mit Hilfe der Northern-Technik, eines Verfahrens zum Nachweis von RNA-Molekülen, also der Transkription eines Gens, unter Einsatz des MDR-Gens als Sonde (Figur 10). Resistente Zellen zeigen eine Bande, nichtresistente Zellen (Zustand am Beginn der Behandlung) zeigen keine Bande.

0,5 oder 1 μ g/ml BVDU zusammen gegeben (BDVU wirkt in menschlichen Tumorzellen erst ab etwa 10 μ g/ml to-xisch, in Zellen der Maus ab etwa 8 μ g/ml (Figuren 8 und 9). BVDU verhindert die Resistenzbildung gegenüber Adriamycin. Die Tumorzellen bleiben empfindlich gegenüber der Zytostatikabehandlung und sterben ab. Die Wirkung des BVDU ist so stark, daß die Behandlung

In Parallelversuchen wird Adriamycin mit entweder

35

11

durch Ruhepausen (Wachstum ohne Substanzen) unterbrochen werden muß, sich der Versuch also über 6 bis 8 Wochen erstreckt.

- 5 BVDU + Adiamycin-Behandlung führt zu einer wesentlich schwächeren Amplifikation des MDR-Gens als Adriamycin-Behandlung allein (Figur 10). Der Effekt der BVDU-Behandlung ist in Wirklichkeit noch sehr viel größer, als die Abschwächung der Bande ausdrückt. Am Ende der Behandlung bleiben nämlich nur Zellen übrig, 10 die wenigstens eine gewisse Resistenz gegenüber der Adriamycin-Behandlung erworben haben. Die infolge der BVDU-Behandlung nichtresistent gebliebenen Zellen sind bereits vorher abgestorben. Der eigentlich relevante und mit Hilfe der Northern-Technik nicht faß-15 bare Effekt besteht deshalb im Absterben der nichtresistenten Zellen, welche in den Inaktivierungskurven (Figuren 8 und 9) gemessen wird.
- Da die Resistenzbildung gegenüber Zytostatikabehandlung in menschlichen Tumoren ebenfalls auf der Amplifikation des MDR-Gens beruht, ist durch die Kombination von BVDU mit einem beliebigen Zytostatikum die
 Möglichkeit geboten, die Therapie in niedrigen Dosen
 und über längere Zeiträume als bisher durchzuführen.
 Im übrigen ist die Verhinderung der Resistenzbildung
 auch für andere Anwendungen von großer Bedeutung.
 - D. Verhinderung der Bildung von "Multi-Drug-Resistance" (MDR) in Tumorzellen gegenüber Zytostatikabehandlung durch gleichzeitige Gabe von anti-rekombinogenen 5'substituierten Nukleosiden

30

In den Figuren 11 und 12 ist zu sehen, daß die antirekombinogene Wirkung nicht nur spezifisch für BVDU

12

gilt, sondern eine Eigenschaft aller 5'-substituierten Nukleoside ist.

Fig. 11 zeigt dabei die anti-rekombinogenen Effekte von (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridin, (E)-5-(2-bromovinyl)-1-B-D-arabinofuranosyl-uracil und (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxy-4'-thiouridin in Saccharomy-ces cerevisiae MP1, und

5

- Fig. 12 die anti-rekombinogenen Effekte von 5-Jodo-2'-deoxycytidin, 5-Jodo-2'-deoxyuridin und 2'-Deoxy-5-trifluoromethyluridin in Saccharomyces cerevisiae MP1.
- 15 Die Tumorzellinie F4-6-WT der Maus (WT = Wildtyp = empfindlich gegenüber Zytostatikabehandlung = keine Amplifikation des MDR-Gens) wurde über mehrere Wochen mit stufenweise steigenden Konzentrationen von Adriamycin behandelt. Im Laufe der Behandlung erwarben die 20 Zellen eine Resistenz gegenüber dieser Behandlung. Wirken gegenüber nichtresistenten Zellen 20 ng/ml Adriamycin bei einer Behandlungszeit von 4 Tagen stark toxisch, so sind die Zellen nach Langzeitbehandlung mit stufenweise steigenden Konzentrationen 25 gegenüber 20 ng/ml Adriamycin völlig unempfindlich geworden (Figur 13 und 14). Die Resistenzbildungberuht auf der Amplifikation des MDR-Gens. Nachgewiesen wurde dies mit Hilfe der Northern-Technik, eines Verfahrens zum Nachweis von RNA-Molekülen, also der 30 Transkription eines Gens, unter Einsatz des MDR-Gens als Sonde (Figur 15). Resistente Zellen zeigen eine Bande, nichtresistente Zellen (Zustand am Beginn der

Behandlung) zeigen keine Bande. Die Level von ß-Actin

mRNA wurden vergleichsweise ebenfalls analysiert.

B-Actin wurde als interne Kontrolle für die RNA-Menge benutzt.

In Parallelversuchen wurde Adriamycin mit 1 µg/ml je eines 5'substituierten Nukleosids zusammen gegeben. Alle sechs 5'-substituierten Nukleoside verhindern die Resistenzbildung gegenüber Adriamycin. Die Tumorzellen bleiben empfindlich gegenüber der Zytostatikabehandlung und sterben ab. Die Wirkung der 5'substituierten Nukleoside war so stark, daß die Behandlung durch Ruhepausen (Wachstum ohne Substanzen) unterbrochen werden mußte, sich der Versuch also über 6 bis 8 Wochen erstreckte.

- Figur 15 zeigt die Northern Blot Analyse der RNA:
 Expression der MDR-Gene in der Tumorzellinie F4-6-WT
 der Maus. Die Level von ß-Actin mRNA wurden vergleichsweise ebenfalls analysiert. ß-Actin wurde als
 interne Kontrolle für die RNA-Menge benutzt.
- pos. Adriamycin-resistente F4-6-WT Zellen neg. Adriamycin-empfindliche F4-6-WT Zellen

25

- 1 μ g/ml (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridin + Adriamycin
- 2 1 μ g/ml (E)-5-(2-bromovinyl-1- β -D-arabinofurano-syl-uracil + Adriamycin
- 3 1 μ g/ml (e)-5-(2-bromovinyl-2'-deoxy-4'-thiouri-din + Adriamycin
- 4 1 μ g/ml 5-Jodo-2'-deoxycytidin + Adriamycin
- 5 1 μ g/ml 5-Jodo-2'-deoxyuridin + Adriamycin
- 30 6 1 mg/ml 2'-Deoxy-5-trifluoromethyluridin + Adriamycin
 - 7 1 μ g/ml (E)-5-(2-bromovinyl-)-2'-deoxyuridine (BVDU) + Adriamycin

5'-substituiertes Nukleosid + Adriamycin-Behandlung führt zu einer wesentlich schwächeren Amplifikation des MDR-Gens als Adriamycin-Behandlung allein (Figur 15). Der Effekt der Behandlung ist in Wirklichkeit noch sehr viel größer als es die Abschwächung der Bande ausdrückt. Am Ende der Behandlung bleiben nämlich nur Zellen übrig, die wenigstens eine gewisse Resistenz gegenüber der Adriamycin-Behandlung erworben haben. Die infolge der BVDU-Behandlung nichtresistent gebliebenen Zellen sind ja bereits vorher abgestorben. Der eigentlich relevante und mit Hilfe der Northern-Technik nicht faßbare Effekt besteht deshalb im Absterben der nichtresistenten Zellen, welcher in den Inaktivierungskurven (Figur 13 und 14) gemessen wurde.

10

15

Patentansprüche

- Verwendung von 5'-substituierten Nukleosiden in Kombination mit mindestens einem Zytostatikum zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verhinderung bzw. Reduzierung der Resistenzenbildung bei der Zytostatikabehandlung.
- Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Nukleosid (E)-5-(2-Bromovinyl-)-2'-deoxyuridin (BVDU) und/oder seine Metaboliten verwendet werden.
- 3. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Metabolit (E)-5-(2-Bromovinyl-)-uracyl (BVU) verwendet wird.
- Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Nukleosid (E)-5-(2-bromovinyl)-1-B-D-arabinofuranosyluracil und/oder seine Metaboliten verwendet werden.
- Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Nukleosid (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxy-4'-thiouridin und/oder seine Metaboliten verwendet werden.
- Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Nukleosid 5-Jodo-2'-deoxycytidin und/oder seine Metaboliten verwendet werden.

16

7. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Nukleosid 5-Jodo-2'-deoxyuridin und/oder seine Metaboliten verwendet werden.

5

8. Verwendung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß als Nukleosid 2'Deoxy-5-trifluoromethyluridin und/oder seine
Metaboliten verwendet werden.

10

15

20

- 9. Arzneimittel, enthaltend 5'-substituierte Nukleoside, nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, in einer Menge, aus der eine Konzentration von 0,02 μ g/ml bis 10 μ g/ml im Blut resultiert, mindestens ein Zytostatikum und übliche Träger- und Hilfsstoffe.
- 10. Arzneimittel nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleoside in einer Menge enthalten sind, aus der eine Konzentration von 0,05 μ g/ml bis 5 μ g/ml im Blut resultiert.
- 11. Arzneimittel nach Anspruch 9 oder 10,
 25 dadurch gekennzeichnet, daß die Zytostatika ausgewählt sind aus Alkaloiden, Alkylantien, Antimetaboliten, Antibiotika oder Cisplatin.

FIG. 1

RELATIVER DNA-GEHALT

1000 4000 30 DNA-Amplifikation in Zellen des Chinesischen Hamsters Kontrolle Kontrolle 10 TEM Positivkontrolle: Genotoxische Kanzerogene µg/ml Aceton µg/ml TEM 100 Negativkontrolle: Nicht-Kanzerogene Aceton 0.1 0.01 S 40 0 30 20 10 0.3 Kontrolle Kontrolle 4-NQ0 0.1 1000 µg/ml Dlmethylformamld 49/ml 4-NQO Dimethylformamid 100 0.01 0.001 9 S က N က 2 0

2/15

FIG.2

DNA-Amplifikation in Zellen des Chinesischen Hamsters

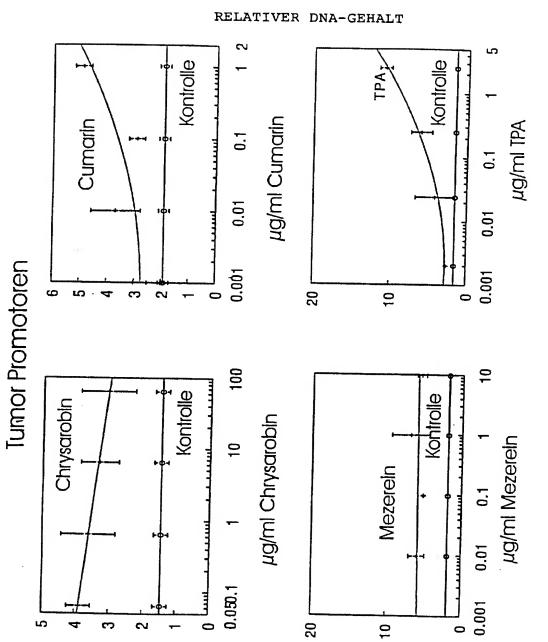
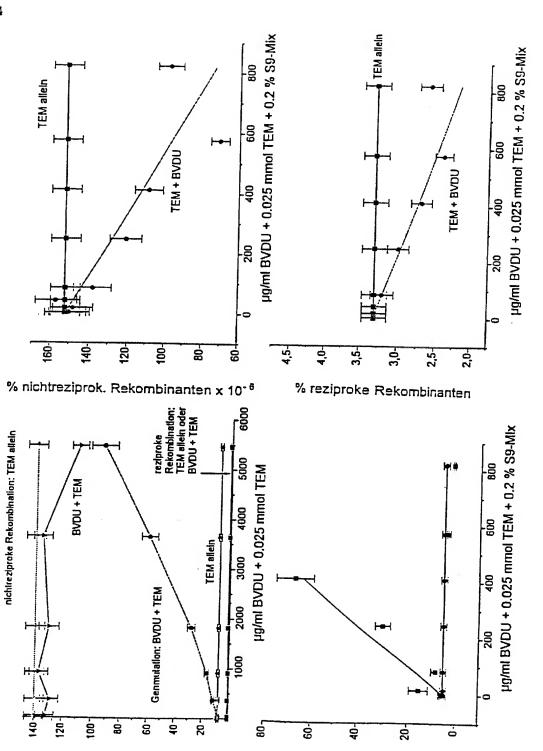


FIG. 3

RELATIVER DNA-GEHALT DNA-Amplifikation in Zellen des Chinesischen Hamsters 500 Kontrolle Kontrolle 9 1000 Testosteron + AMP µg/ml Thioacetamid 10 **Thioacetamid** 0 0.1 Nicht-Genotoxische Kanzerogene Testosteron ohne und mit S9-Mix 0.1 0.001 0.01 20 10 0 9 4 7 500 100 Kontrolle Kontrolle 100 Testosteron + MTX 10 µg/ml Acetamid Acetamid 0.1 0.02 30 20 10 9 2 4 က

FIG. 4

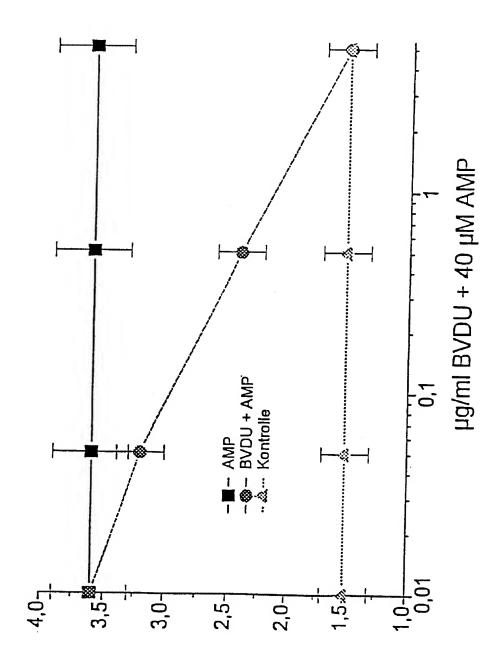


% nichtreziproke Rekombinanten/Mutanten x 10⁻⁵ % reziproke Rekombinanten

% Mutanten x 10⁻⁶

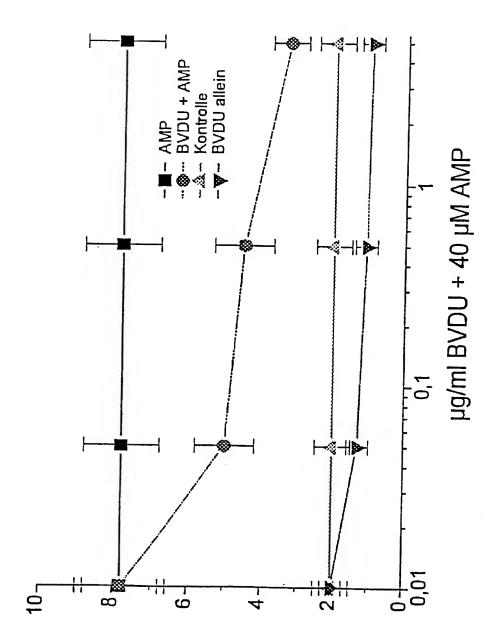
ERSATZBLATT (REGEL 26)

5/15 FIG. 5



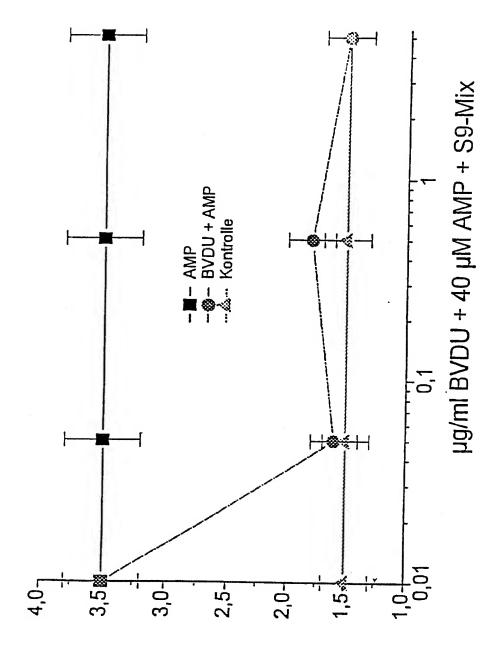
relativer DNA-Gehalt

FIG. 6



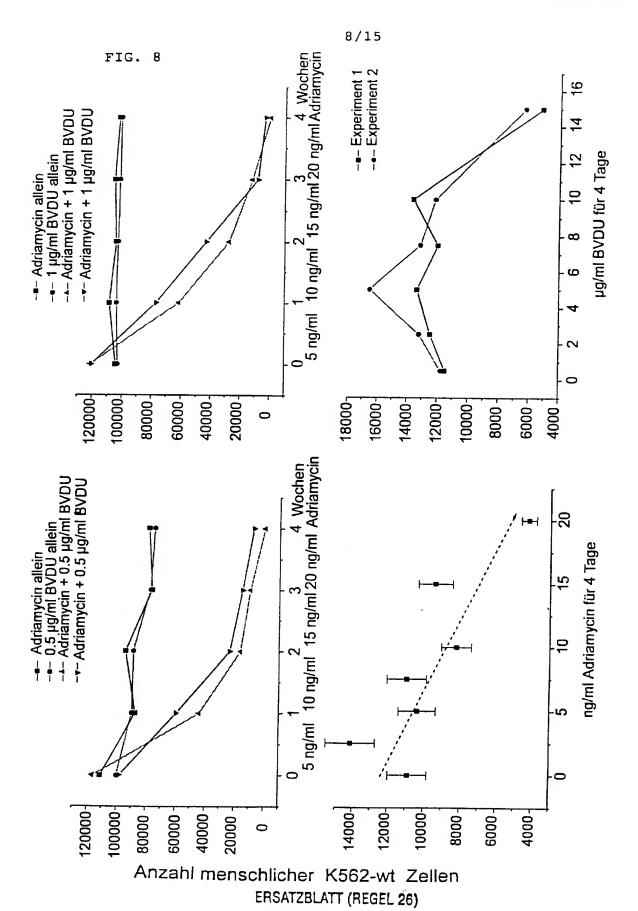
relativer DNA-Gehalt

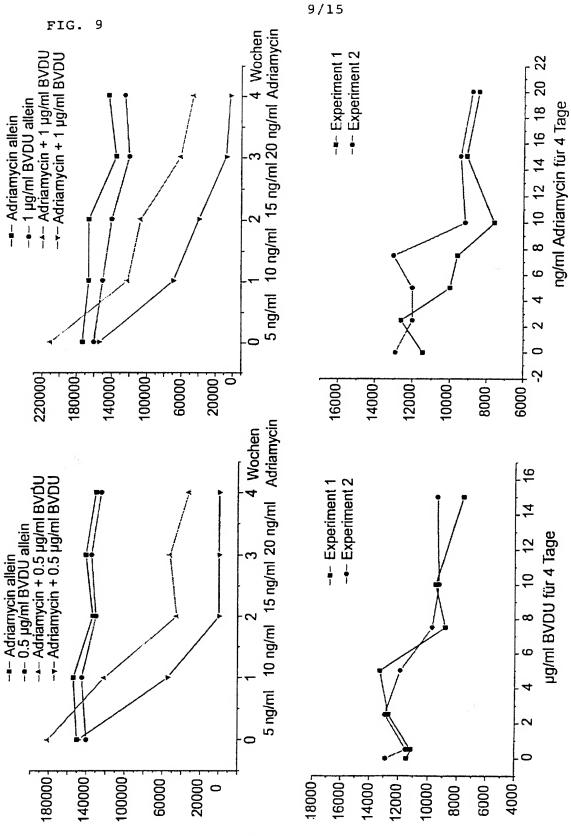
FIG. 7



relativer DNA-Gehalt

ERSATZBLATT (REGEL 26)





Anzahl von F4-6-wt Mauszellen ERSATZBLATT (REGEL 26)

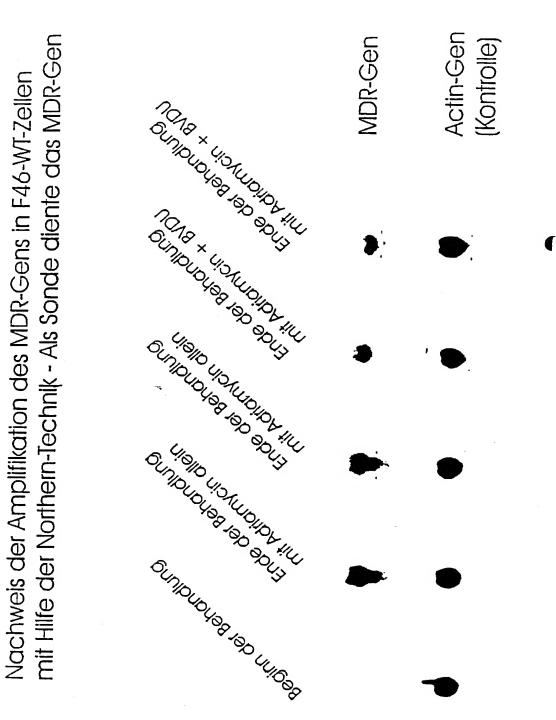
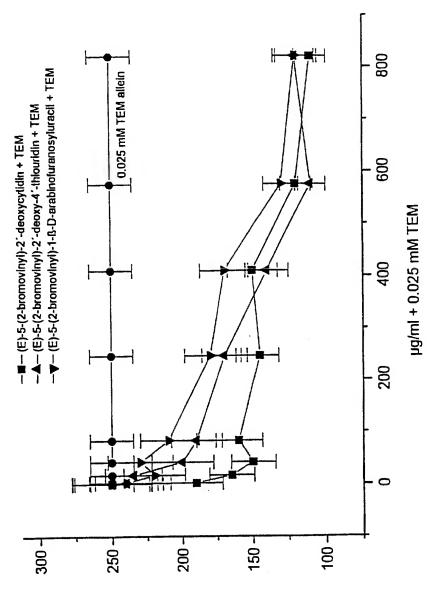


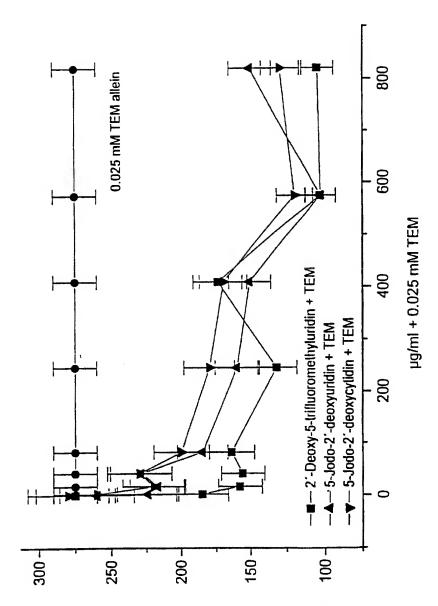
FIG: 10

FIG. 11



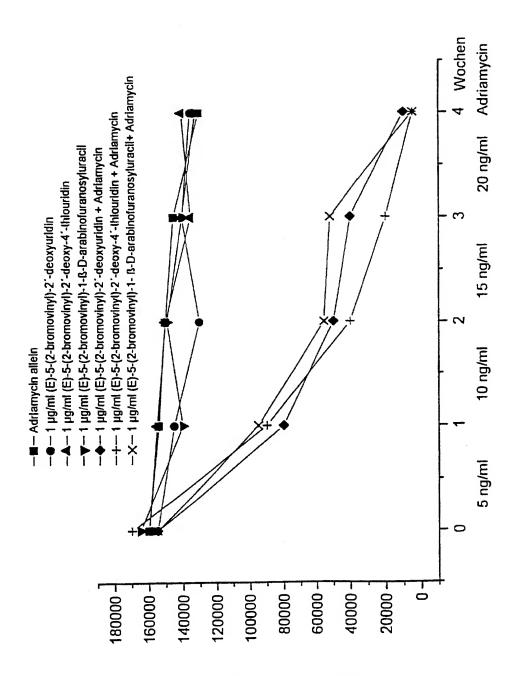
% nichtreziproke Rekombinanten x 10⁻⁶

FIG. 12



% nichtreziproke Rekombinanten x 10 -6

FIG. 13

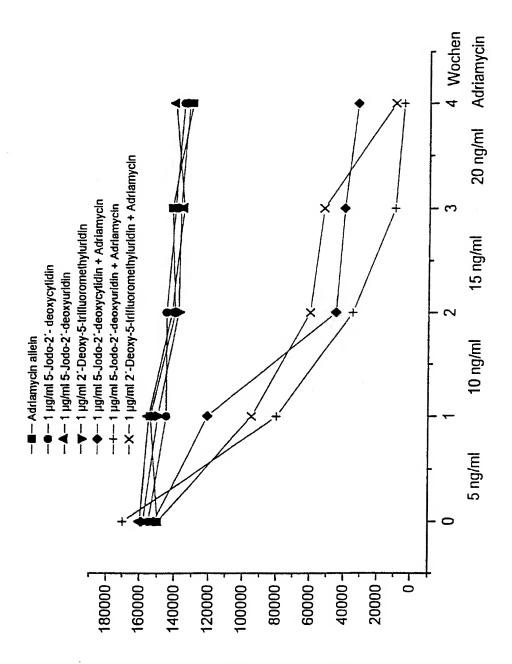


Anzahl F4-6-wt Tumorzellen

ERSATZBLATT (REGEL 26)

14/15

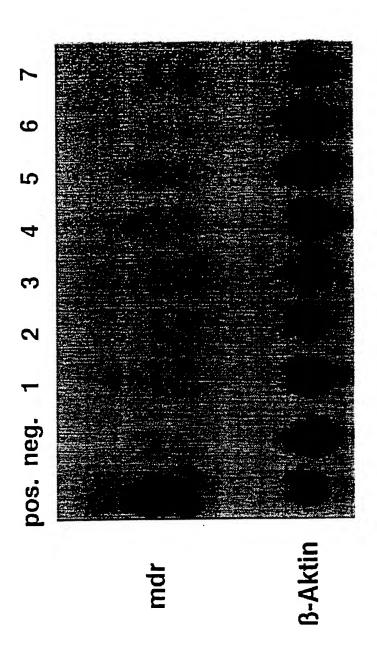
FIG. 14



Anzahl F4-6-wt Tumorzellen

ERSATZBLATT (REGEL 26)

FIG. 15



ional Application No

PCT/DE 96/00169 A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 A61K31/70 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC **B. FIELDS SEARCHED** Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Relevant to claim No. Category ' Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages INDIAN JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY. 1,7,11 X vol. 22, no. 6, 1984, pages 333-334, XP000574699 CHAKRABARTY, MISHRA: "LOSS OF PLASMID LINKED DRUG RESISTANCE AFTER TREATMENT WITH IODO-DEOXYURIDINE see page 334 TODAY'S LIFE SCIENCE, X 1,2,11 vol. 2, no. 9, 1990, pages 32-38 80, XP000575102 S. LOCARNINI: "HEPATITIS B ANTIVIRAL THERAPY" A see page 37, left-hand column - page 38, 3-5,7,8middle column; table 1 -/--X Further documents are listed in the continuation of box C. Х Patent family members are listed in annex. Special categories of cited documents: "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance invention "E" earlier document but published on or after the international "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone filing date document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such docu-"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or ments, such combination being obvious to a person skilled document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "&" document member of the same patent family Date of the actual completion of the international search Date of mailing of the international search report

5 July 1996

1

15.07.96

Name and mailing address of the ISA Authorized officer

European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Ripwijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016

Kanbier, D

Form PCT/LSA/210 (second sheet) (July 1992)

International application No. PCT/DE 96/00169

Box I	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)
This inte	rnational search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:
1.	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. X	Claims Nos.: 1-11 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
	In view of the large number of compounds which are defined by the wording of the claims, the search has been performed on the general idea and compounds mentioned in the examples of the description.
3.	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)
This Inte	mational Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
	was ever and the second second in the second
J.	
1.	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
	, it is eavered by claims (tost.
Remark	on Protest
	No protest accompanied the payment of additional search fees.

Inter onal Application No PCT/DE 96/00169

	PCI/DE 90/00109	
Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Rejevant to claim No.	
EP,A,O 488 718 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 3 June 1992 see page 4; claims 1,6,8,13,15; example 6	1,11	
BE,A,640 236 (SODERSI) 16 March 1964 see page 4; claims 1-3,6,7 see page 10	1,11	
EUROPEAN JOURNAL OF CANCER & CLINICAL ONCOLOGY, vol. 20, no. 4, 1984, pages 471-476, XP000575098 WILDIERS, DE CLERCQ: "ORAL (E)-5-(2-BROMOVINYL)-2'-DEOXYURIDINE TREATMENT OF SEVERE HERPES ZOSTER IN CANCER PATIENTS"	1,2,11	
see page 472, right-hand column; table 2	9,10	
CANCER RESEARCH, vol. 54, no. 10, 1994, pages 2701-2706, XP000574738 CHI, KUNUGI, KINSELLA: "IODODEOXYURIDINE CHEMOSENSITIZATION OF CIS-DIAMMINEDICHLOROPLATINUM(II) IN HUMAN BLADDER CANCER CELLS" see page 2705, right-hand column see page 2701-2	1,7,11	
J. CELL. PHARMACOL., vol. 1, no. 1, 1990, pages 2-7, XP000575045 WROBLEWSKI, HACKER: "THE POSSIBLE ROEL OF ALTERED NUCLEOTIDE METABOLISM IN CISPLATIN RESISTANCE" see page 6, left-hand column	1,7,11	
GB,A,1 473 148 (RESEARCH CORPORATION) 11 May 1977 see page 1, right-hand column - page 2, left-hand column; claim 1	1,11	
	LTD) 3 June 1992 see page 4; claims 1,6,8,13,15; example 6 BE,A,640 236 (SODERSI) 16 March 1964 see page 4; claims 1-3,6,7 see page 10 EUROPEAN JOURNAL OF CANCER & CLINICAL ONCOLOGY, vol. 20, no. 4, 1984, pages 471-476, XP000575098 WILDIERS, DE CLERCQ: "ORAL (E)-5-(2-BROMOVINYL)-2'-DEOXYURIDINE TREATMENT OF SEVERE HERPES ZOSTER IN CANCER PATIENTS" see page 472, right-hand column; table 2 CANCER RESEARCH, vol. 54, no. 10, 1994, pages 2701-2706, XP000574738 CHI, KUNUGI, KINSELLA: "IODODEOXYURIDINE CHEMOSENSITIZATION OF CIS-DIAMMINEDICHLOROPLATINUM(II) IN HUMAN BLADDER CANCER CELLS" see page 2705, right-hand column see page 2701-2 J. CELL. PHARMACOL., vol. 1, no. 1, 1990, pages 2-7, XP000575045 WROBLEWSKI, HACKER: "THE POSSIBLE ROEL OF ALTERED NUCLEOTIDE METABOLISM IN CISPLATIN RESISTANCE" see page 6, left-hand column GB,A,1 473 148 (RESEARCH CORPORATION) 11 May 1977 see page 1, right-hand column - page 2,	

Form PCT/ISA/218 (continuation of second sheet) (July 1992)

Information on patent family members

Int Tonal Application No PCT/DE 96/00169

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0488718	03-06-92	AT-T- DE-D- DE-T- JP-A- US-A-	132756 69116321 69116321 5078256 5250296	15-01-96 22-02-96 23-05-96 30-03-93 05-10-93
BE-A-640236	16-03-64	FR-A- FR-M-	1567001 2824	16-05-69
GB-A-1473148	11-05-77	NONE	•	

onales Aktenzeichen

PCT/DE 96/00169 A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 6 A61K31/70 Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK **B. RECHERCHIERTE GEBIETE** Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 A61K Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile Kategorie* Betr. Anspruch Nr. Х INDIAN JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY, 1,7,11 Bd. 22, Nr. 6, 1984, Seiten 333-334, XP000574699 CHAKRABARTY, MISHRA: "LOSS OF PLASMID LINKED DRUG RESISTANCE AFTER TREATMENT WITH IODO-DEOXYURIDINE" siehe Seite 334 X TODAY'S LIFE SCIENCE. 1.2.11 Bd. 2, Nr. 9, 1990, Seiten 32-38 80, XP000575102 *HEPATITIS B ANTIVIRAL S. LOCARNINI: Α siehe Seite 37, linke Spalte - Seite 38, 3-5,7,8 mittlere Spalte; Tabelle 1 -/--Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu İΧ Siche Anhang Patentfamilie entnehmen Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen 'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als bezonders bedeutzam anzusehen ist Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden 'L' Veröffentlichung, die gezignet ist, einen Prioritätsanspruch zweiselhast er-scheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategone in Verbindung gebracht wird und diese Verbandung für einen Fachmann naheliegend ist soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie soll oder die aus einem anderen devoluseten verschaften werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehren Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht Veröffentlichung, die vor dem internationalen Ammeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdamm veröffentlicht worden ist

Weröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist Veröffentlichung die Mitglied derselben Patentfamilie ist Absendedatum des internationalen Recherchenberichts Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 15.07.96 5.Juli 1996 Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Bevollmächtigter Bediensteter Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentiaan 2

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,

Fax: (+31-70) 340-3016

1

Kanbier, D

Int ionales Aktenzeichen
PCT/DE 96/00169

		PC1/DE 90/00109
C.(Fortsetza	me) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht komm	penden Tale Betr. Anspruch Nr.
X	EP,A,O 488 718 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 3.Juni 1992 siehe Seite 4; Ansprüche 1,6,8,13,15; Beispiel 6	1,11
X	BE,A,640 236 (SODERSI) 16.März 1964 siehe Seite 4; Ansprüche 1-3,6,7 siehe Seite 10	1,11
X	EUROPEAN JOURNAL OF CANCER & CLINICAL ONCOLOGY, Bd. 20, Nr. 4, 1984, Seiten 471-476, XP000575098 WILDIERS, DE CLERCQ: "ORAL (E)-5-(2-BROMOVINYL)-2'-DEOXYURIDINE TREATMENT OF SEVERE HERPES ZOSTER IN CANCER PATIENTS"	1,2,11
A	siehe Seite 472, rechte Spalte; Tabelle 2	9,10
X	CANCER RESEARCH, Bd. 54, Nr. 10, 1994, Seiten 2701-2706, XP000574738 CHI, KUNUGI, KINSELLA: "IODODEOXYURIDINE CHEMOSENSITIZATION OF CIS-DIAMMINEDICHLOROPLATINUM(II) IN HUMAN BLADDER CANCER CELLS" siehe Seite 2705, rechte Spalte siehe Seite 2701-2	1,7,11
A	J. CELL. PHARMACOL., Bd. 1, Nr. 1, 1990, Seiten 2-7, XP000575045 WROBLEWSKI, HACKER: "THE POSSIBLE ROEL OF ALTERED NUCLEOTIDE METABOLISM IN CISPLATIN RESISTANCE" siehe Seite 6, linke Spalte	1,7,11
A	GB,A,1 473 148 (RESEARCH CORPORATION) 11.Mai 1977 siehe Seite 1, rechte Spalte - Seite 2, linke Spalte; Anspruch 1	1,11

nationales Aktenzeichen

PCT/DE96/00169

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)
Gemäß Artikel 17(2)2) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:
1. Ansprüche Nr. weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
weii 510 2001 22 0-5000 200 000 000 000 000 000 000 000 000
2. X Ansprüche Nr. 1-11
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
In view of the large number of compounds which are defined by the wording
of the claims, the search has been performed on the general idea and
compounds mentioned in the examples of the description.
3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.
Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)
Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:
1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser
internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen
Gebühr aufgefordert.
Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt.
, .
•
Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inte onales Aktenzeichen
PCT/DE 96/00169

Im Recherchenbericht ngeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP-A-0488718	03-06-92	AT-T- DE-D- DE-T- JP-A- US-A-	132756 69116321 69116321 5078256 5250296	15-01-96 22-02-96 23-05-96 30-03-93 05-10-93
BE-A-640236	16-03-64	FR-A- FR-M-	1567001 2824	16-05-69
GB-A-1473148	11-05-77	KEINE		